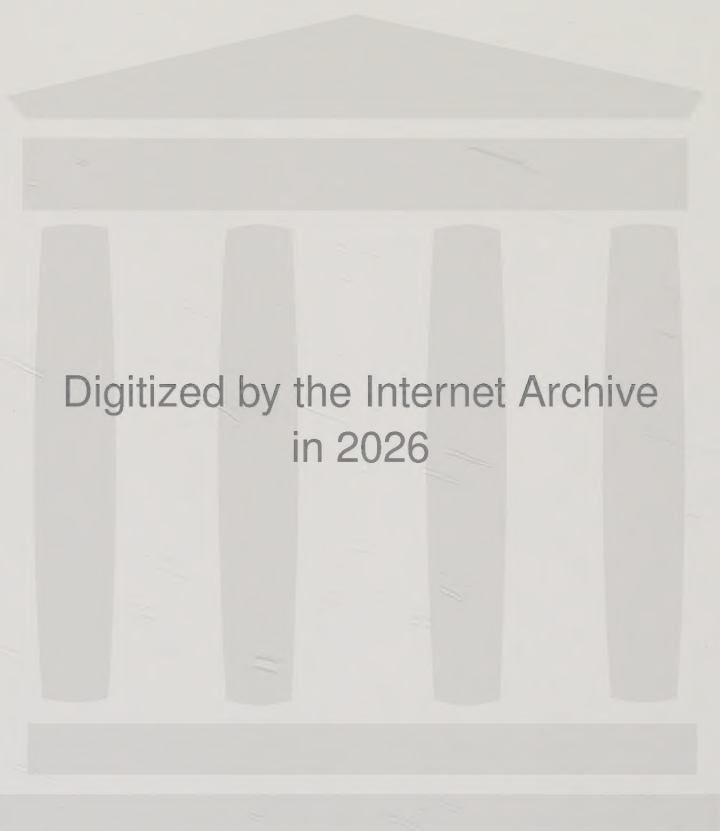


Karl-Heinz Heider

1958

Miss Mainz

1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554416_0131

Aus dem Hygienischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Prof.Dr.med. H. K l i e w e

D I E W I R K U N G V O N Ä T H Y L E N O X Y D
A U F V I R E N

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung

der Doktorwürde in der Zahnheilkunde der
Hohen Medizinischen Fakultät der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Karl-Heinz Heider

Isney / Allgäu

1 9 5 7

Dekan : Prof. Dr. med. H.U. Köttgen
Referent : Privatdozent Dr. med. Theo Lammers
Correferent : Prof. Dr. med. H. Kliewe

Datum des Diploms : 18. Juni 1958



In Dankbarkeit meinen Eltern
und meiner Ehefrau Elisabeth
gewidmet

I n h a l t

DIE WIRKUNG VON ÄTHYLENOXYD AUF VIREN

- I) Einleitung
- II) Empfindlichkeit von Viren chemischen und thermischen Einflüssen gegenüber
 - a) Thermoresistenz der Viren
 - b) Chemoresistenz der Viren
 - c) In der Literatur vorliegende Ergebnisse mit Äthylenoxyd
- III) Keimtötende Wirkung eines Gasgemisches von 90 % Kohlendioxyd und 10 % Äthylenoxyd bei einem Druck von 5 atü auf unterschiedliche Viren
 - a) Versuchsanordnung
 - 1) Apparative Voraussetzungen
 - 2) Vorbereitung der Testobjekte
 - 3) Testkeime
 - 4) Sterilisationsverfahren
 - 5) Überprüfung des Sterilisationserfolges
 - b) Versuchsergebnisse
- IV) Diskussion
- V) Zusammenfassung

I) Einleitung

In jüngerer Zeit wurde im Hygienischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz ein Verfahren zur Kaltsterilisation mit Äthylenoxyd entwickelt. Dabei wird das zu sterilisierende Material einem Gasgemisch von 10 % Äthylenoxyd und 90 % Kohlendioxyd bei Temperaturen von 45 - 65 °C und einem Druck von 5 atü ausgesetzt. Dieses Verfahren tötet resistente Erds sporen innerhalb von 90 Minuten ab (KLIEWE und LAMMERS, GEHWALT, KIMMICH) (30, 16, 29). Unklar war bisher, ob dieses chemische Sterilisationsverfahren auch mit Sicherheit Viren inaktiviert. Diese Fragen sollen die folgenden Untersuchungen beantworten.

Wenn wir uns im Rahmen eines neu entwickelten chemischen Sterilisierverfahrens gesondert mit Viren auseinandersetzen, so liegt die Ursache darin, daß keimtötende Stoffe und Gase sich Viren gegenüber völlig andersartig verhalten können als gegenüber Bakterien, Bazillensporen, Pilzen und Pilzsporen. Hierfür möchten wir eine Reihe von Beispielen aus der Literatur anführen.

II) Empfindlichkeit von Viren chemischen und thermischen Einflüssen gegenüber

a) Thermoresistenz der Viren

Durch Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß der Phage Agrobakterium tumefaciens, das Tabakmosaikvirus und das von Margulis und seinen Mitarbeitern gezüchtete disseminierte Encephalomyelitisvirus zu den widerstandsfähigsten Viren gegenüber Wärmeeinwirkung gehören. Der Phage Agrobakterium tumefaciens wird bei 95° C in 5 Minuten inaktiv, eine Aufbewahrung bei 5° C hält er 25 Monate lang aus (BERGEY⁷ (3)). Das Tabakmosaikvirus verträgt die Temperatur von 90° C 10 Minuten und die Temperatur von 94° 5 Minuten lang (DOERR und HALLAUER) (11). Das Margulissche Virus bewahrt seine Infektiosität in einem Wasserbad von 60° C 1 1/2 Stunden und in dem von 75° C 3/4 Stunden hindurch (SCHUBLADSE und GAIDAMOWITSCH) (56)

Zur Inaktivierung für die weniger thermoresistenten Viren ist in der Literatur eine Durchschnittstemperatur von 55 - 60° C bei einer Einwirkungszeit von 30 - 60 Minuten angegeben. Hierher zählen zum Beispiel:

Das Choriomeningitisvirus (ROOYEN und
ROODES) (46)

Das Kolumbia SK-Virus (SMITHBURN und
Mitarbeiter) (51)

Das Herpesvirus (LÖWENSTEIN) (34)

Das Influenzavirus (JONES) (25)

Das Mumpsvirus (HABEL) (22)

Das Vaccinevirus (SALCHOW) (48)

FLEXNER und LEWIS (14) gelang es, das Poliomyelitisvirus bei einer Einwirkungstemperatur von 50°C in 30 Minuten zu inaktivieren. LIGHT und HODES (32) versuchten 1943 virushaltiges Material in kochendem Wasser und in Hitze zu inaktivieren. In kochendem Wasser war das Virus der Kinder-Diarrhoe schon nach 5 Minuten inaktiviert, während es eine Hitze von 70°C eine Stunde lang vertrug. Mc CULLOCH (38) konnte das Fowl pox-Virus (Infektionsdosis 100,000) bei 60°C in ungefähr 5 Minuten, bei 55°C in 15 - 20 Minuten und bei 50°C in einer Stunde erst inaktivieren.

Sehr viel Interesse wurde von jeher dem Hepatitis-Virus beigemessen und es gibt auch wenig genaue Angaben über das Verhalten dieses Virus Hitze gegenüber. GELLIS und seinen Mitarbeitern (15) gelang es zu zeigen, daß das Hepatitis-Virus in Serum suspendiert nach 10 Stunden langer Erhitzung auf 60°C , nach einer Übertragung auf 5 Freiwillige, nicht mehr infektiös war. MURRAY und DIFENBACH (41) erhitzten das Hepatitis-Virus nur 4 Stunden lang auf 60°C und stellten fest, daß das Virus nicht vollkommen inaktiviert war. BOCK (4) glaubt durch Analogischluß aus Versuchen mit dem Theiler-Virus, daß das Hepatitis-Virus durch 10 Minuten langes Sieden in Wasser zu inaktivieren sei, wenn ein Eintrocknen des virushaltigen Materials vermieden wird.

RANSON und HÜBNER (43) erhitzten "Coxiella bruneti" in Milch suspendiert auf 63°C 30 - 40 Minuten und mußten feststellen, daß das Virus noch lebte. RÖMER (45) behauptete 1945: Normales Auskochen reicht nicht aus, um Viren zu inaktivieren.

Von BOCK (4) wurde 1956 die Thermoresistenz der Theiler-Viren bei 20° C, 56° C, 70° C und 90° C geprüft. Es wurde infiziertes Mäusegehirn mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 10 verdünnt und für 10 Minuten in engen Zentrifugenröhrchen bei der gewünschten Temperatur gehalten. Bei 70° C überlebte das Theiler-Virus, war aber in seiner Virulenz stark geschwächt. Selbst bei 90° C konnte das Theiler-Virus nicht vollkommen inaktiviert werden. Nach 2 Minuten Erhitzung in siedendem Wasser waren die Theiler-Viren inaktiviert. Wurden Theiler-Viren in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert im Heißluftsterilisator 5 Minuten lang auf 180° C erhitzt, so erwiesen sie sich nach intracerebraler Impfung auf weiße Mäuse noch infektiös.

Tabelle 1

Die Thermoresistenz des Theiler-Virus nach BOCK

siehe nächste Seite

TABELLE 1. Thermostenz des Theiler-Virus

Suspendierung der Infektionen Organe in	Vorbehandlung	Temperatur	Inaktivierung des Theiler-Virus nach	noch keine völlige Inaktivierung nach
NaCl-Lösung	frisches Material	58° C	-	8 a
Serum	frisches Material	58° C	-	8 a
NaCl-Lösung	frisches Material	60° C	-	8 h
NaCl-Lösung	frisches Material	90° C	-	10 h
NaCl-Lösung	frisches Material	siedendes Wasser	2 min	1 min
NaCl-Lösung	Material getrocknet und resuspendiert	siedendes Wasser	10 min	8 min
Serum	Material getrocknet und resuspendiert	siedendes Wasser	10 min	8 min
NaCl-Lösung	Material getrocknet und resuspendiert	120° C	15 min*	70 min
Serum	Material getrocknet und resuspendiert	120° C	20 min	15 min
NaCl-Lösung	Material getrocknet und resuspendiert	180° C	10 min	5 min
Serum	Material getrocknet und resuspendiert	180° C	5 min	2 min

* in einem Versuch noch nach 80 min aktives Virus nachweisbar.

* Versuchsmäuse hatten lediglich Krankheitssymptome, von denen sie sich wieder erholten.

b) Chemoresistenz der Viren

1) Gegenüber Fermenten:

Trypsin, so stellte LOJKIN und VINSON (35) fest, inaktiviert das Tabakmosaikvirus. Sie erklärten sich die Inaktivierung als Folge von Eiweißverdauung. Nach Versuchen von STANLEY (54) ist jedoch diese Erklärung nicht richtig. Das Virus des Rous-Sarkoms, das Grippevirus und der Pleurapneumonie-Erreger sind dem Ferment Trypsin gegenüber widerstandsfähig.

Papain vermag nach Untersuchungen von TOWARNIZKI (58) Influenzaviren aus der Allantoisflüssigkeit von Hühnerembryos auszufällen. LEPIN (31) gelang es, das Tollwutvirus durch Papain zu inaktivieren. AMOS (1) inaktivierte das Herpesvirus mit Gewebosphosphatasen. LORING (33) konnte durch gereinigte Ribonuclease das Tabakmosaikvirus inaktivieren. Die Phagen, so fand HERSHEY und seine Mitarbeiter (24), werden durch Desoxyribonuclease nicht inaktiviert.

2) Gegenüber Salzen, Metallen und Azetaten:

Alkalimetalle, Salze von Erdmetallen, Metallazetate und Schwermetallsalze bilden mit den Virusarten einen Niederschlag. Die Viren werden von diesen Salzen zum größten Teil ausgesalzen und nicht ausgefällt. Mit 1 % Kupfersulfatlösung inaktivierte DUNHAM und MAC NEAL (12) das Influenzavirus in Allantoisflüssigkeit innerhalb 3 Minuten, während das Vaccine-Virus unter diesen Bedingungen

nicht inaktiviert werden konnte.

YAOI und KASAI (59) konnten das Vaccine-Virus in 1 % Kupferchloridlösung bei 30 Minuten Einwirkungszeit nicht inaktivieren.

3) Gegenüber Alkohol:

Die Viren sind gegenüber Alkohol im Durchschnitt resistenter als Bakterien. Das Virus der Tabaknekrose ist am widerstandsfähigsten gegenüber Alkohol. Es behält bei Zimmertemperatur in absolutem Alkohol 6 Monate lang seine Infektiosität. 1925 inaktivierte GORDEN (19) das Vaccine-Virus in 50 % Äthylalkohol in einer Stunde; mit 20 % Äthylalkohol war das Virus noch nach 24 Stunden infektiös. 20 % Methylalkohol bewirkte innerhalb einer Stunde eine starke Virulenzschwächung bei den Vaccine-Viren und inaktivierte sie in 24 Stunden. Das Newcastle-Virus wurde von CUNNINGHAM (9) mit 70 - 95 % Alkohol in einer Zeit von 3 Minuten inaktiviert. Bei einer Alkoholkonzentration von 40 - 45 % waren die Viren nach 3 Minuten noch nicht inaktiviert. Obwohl wenig genaue Angaben bezüglich der Alkoholempfindlichkeit bei einer großen Zahl von Viren zur Verfügung stehen, kann trotzdem gesagt werden, daß tierische und menschliche Viren, ausgenommen Phagen, Alkohol gegenüber empfindlich sind.

4) Gegenüber Formalin:

Formalin ist ein gebräuchliches Desinfektionsmittel. Interessant vor allem ist bei den Viren, daß Formalin Viren inaktiviert, ohne ihnen die immunisierende Wirkung zu nehmen.

SMORODINSEFF (52) inaktivierte das Frühsommer-encephalitisvirus in 1 : 600 verdünntem Formalin bei einer Einwirkungstemperatur von 37°C innerhalb von 3 Tagen. Das Grippevirus konnte in 8 Tagen durch 0,08 % Formalin inaktiviert werden. MOCSY (40) konnte das Virus der infektiösen Anaemie der Pferde mit Formalin bei einer Einwirkungstemperatur von 0°C in 48 Stunden inaktivieren. SCHWERDT (49) und Mitarbeiter beobachteten, daß eine relativ reine Suspension von Poliomyelitisviren Typ Lansing mit einem Infektionstiter von $10^{4,2}$ 12 Stunden lang in 0,1 % Formalin infektiös blieb. Erst nach 24 Stunden waren die Poliomyelitisviren inaktiviert. SALK (47) hat 1953 Formalin zur Inaktivierung von Poliomyelitisviren zur Herstellung von Impfstoff verwandt. 1955 haben HAAS, KELLER und KIKUTH (20) Messungen und Versuche über die Inaktivierung von Poliomyelitisviren nach der Methodik von Salk durchgeführt. Die Ergebnisse der vorher genannten wurden von HAAS (21) und seinen Mitarbeitern vervollständigt. DEUTSCH und ROHR (10) beobachteten, daß Formalin eine nennenswerte Wirkung auf Coli-T₂-Phagen besitzt. Nach Untersuchungen von GÖNNERT und BOCK (18) wirkt Formalin gegen Bronchopneumonie-, Ektromelie-, Herpes-, Influenza- und Encephalomyocarditisviren und läßt selbst eine Beeinflussung des Mäusepoliomyelitis-Virus erkennen.

5) Gegenüber Äther:

10 % Äther inaktiviert die Viren der Psittakosis und der vierten Geschlechtskrankheit bei Zimmertemperatur in 30 Minuten (MEYER)

(39). Das Masernvirus ist jedoch nach 40 Minuten noch infektiös (ENDERS) (13). Das gereinigte Influenzavirus verliert nach 90 Minuten Behandlung mit Diaethyläther seine Infektiosität (STOCK und FRANCIS) (55). HABEL (22) konnte das Mumpsvirus in Eidotteremulsion mit 1,5 Volumen Äther bei 4° C und 30 Minuten inaktivieren. Dem Katzenpneumonitis-Virus nehmen BROWN, ITATANI und MOULDER (6) mit peroxydfreiem Äther bei 0° C und 15 Minuten 99 % seiner Infektiosität. Das Tollwutvirus ist Äther gegenüber sehr resistent. Es war an der Oberfläche von Nervengewebe nach 60 Minuten inaktiv (REMLINGER) (44). Die Erreger der Psittakosis, des Herpes, der Influenza, der Mumps, der Geflügelpest, der Encephalitiden und des Gelbfiebers sind gegen Äther empfindlich. Nicht empfindlich sind die Pocken-, Tollwut-, Poliomyelitis- und Coxsackie-Viren. Überhaupt nicht angegriffen von Äther werden das Tabakmosaikvirus und einige Phagen (ANDREWS und HORSTMANN) (2).

6) Gegenüber Seifen:

Seifen töten im allgemeinen Viren gut ab. Besonders wirksam sind die mit Formaldehyd oder Carbol vermischten Kaliseifen (SINCOWICS) (50). SCHUBLADSE und GAIDAMOWITSCH (56) konnten mit 3 - 5 % Lysollösung das Encephalitis-Virus, das Grippe- und Mäuseektromelio-Virus in 3 - 5 Minuten und das Virus der Frühsommerencephalitis in 1 Minute inaktivieren. Das Coxsackievirus konnte mit 5 % Lysollösung nicht inaktiviert werden. Nach Untersuchungen von GÖNNERT und BOCK (18) zeigt 1 % Lysol bei Zimmertemperatur nach einer Stunde bei dem Ektromelie-, Herpes- und In-

fluenzavirus eine gute, bei dem Bronchopneumovirus jedoch nur eine sehr geringe Wirkung. Kresolseifen weisen unter denselben Bedingungen bei dem Ektromelie- und Influenzavirus eine Wirkung auf, während das Bronchopneumonie- und Herpesvirus von Kresolseifen kaum angegriffen wird.

7) Gegenüber oberflächenaktiven Stoffen:

Die Virusarten der Pferdeanämie und der Schweinepest werden durch Saponinlösungen inaktiviert. Das Pferdepestvirus ist einer 5 - 10 % Saponinlösung gegenüber resistent (THEILER) (57). LUSH und BURNET (7) prüften die Wirkung von Saponin an einer großen Zahl von Viren bei einer Einwirkungstemperatur von 36° C und einer Einwirkungszeit von 2 Stunden. STOCK und FRANCIS (55) beobachteten, daß verschiedene Natriumsalze bei einem pH 7,5 das Influenzavirus inaktivieren.

8) Gegenüber Basen und Säuren:

SCHUBLADSE und GAIDAMOWITSCH (56) fanden, daß Viren durch starke Basen und Säuren inaktiviert werden. Die Laugen sollen besonders wirksam sein. Das Virus der schottischen Encephalitis ist in 1 Minute durch 1,5 % Ätznatron zu inaktivieren. Allerdings schreiben die angeführten Autoren, daß alkalische Lösungen von großer Konzentration die Gewebsmassen koagulieren. Es ist also möglich, wenn das sorgfältige Mischen versäumt wird, daß das Virus im Innern des Koagulums am Leben bleibt.

9) Gegenüber Oxydationsmitteln:

Viren zeigen gegenüber Oxydationsmitteln eine sehr hohe Empfindlichkeit. Wasserstoffsupperoxyd inaktiviert die Virusarten. Das Kaliumpermanganat inaktiviert in einer Verdünnung von 1 : 1000 des Herpes- und Poliomyelitisvirus und viele Bakteriophagen (LEVADITI und (LEPIN) (31). Chlor vermag unter bestimmten Bedingungen Viren zu inaktivieren (SMORODIN-ZEWA) (53).

10) Gegenüber Reduktionsmitteln:

Es ist möglich, durch ein Oxydationsmittel geschädigte Viren mittels eines Reduktionsmittels zu reaktivieren. Trotzdem gibt es Virusarten, die unter dem Einfluß eines Reduktionsmittels ihre Infektiosität verlieren. CYSTEIN inaktiviert zum Beispiel das Virus der Maul- und Klauenseuche (HECKE) (23).

c) In der Literatur vorliegende Ergebnisse
mit Äthylenoxyd

1928 wurde man durch COTTON und ROARK (8), die Äthylenoxyd als insektentötendes Mittel bekanntmachen, auf dieses Gas aufmerksam. KAY und seine Mitarbeiter IRMINGER und PHILIPS (27) haben versucht, mit Äthylenoxyd Antibiotika zu sterilisieren. GINSBERG und WILSON (17) fanden, daß flüssiges Äthylenoxyd bei 4° C gewisse Viren inaktivieren.

1953 stellten MATHEWS und HOFSTADT (37) mit einem Gasgemisch von 10 % Äthylenoxyd und 90 % Kohlendioxyd Inaktivierungsversuche an Viren an. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur in einem umgebauten Autoclaven ausgeführt. Der Autoclav war mit einer Glasflasche und einer Vakuumpumpe verbunden. Die Zuleitungsrohre waren mit Sicherheitsventilen versehen. Mit der Vakuumpumpe wurde im Versuchsraum ein luftleerer Raum von ungefähr 25 mm Hg geschaffen. Anschließend ließ man in den Versuchsraum so viel Gasgemisch einströmen, bis dort ein Druck herrschte, der dem Atmosphärendruck gleich war. Die Prüfung erfolgte bei einem Druck von 1,500 mm "Carboxyd" (10 % Äthylenoxyd und 90 % Kohlendioxyd). Bei diesen Versuchen wurden folgende Ergebnisse erzielt (Tabelle 2) :

Tabelle 2

Die Inaktivierung von verschiedenen Viren mit einem Gasgemisch von 10 % Äthylenoxyd und 90 % Kohlen-~~monoxyd~~ dioxyd bei einem Druck von 1,500 mm.

Einwirkungszeit: 16 Stunden (MATHEWS and HOFSTAD)

Viability following 16 hours exposure to Carboxide

VIRUS	*Carboxide		CO ₂ Control	
	Wet	Lyoph.	Wet	Lyoph.
Hog cholera	—*	—	+§	+
Rous sarcoma	—	—	+	+
Rabies	—	+	+	+
Mouse encephalomyelitis	—	+	+	+
Chronic respiratory disease agent	—	+	+	+
Laryngotracheitis	—	+	+	+
Fowlpox	—	+	+	+
Vaccinia	—	+	+	+
Swinepox	—	—	+	+
Infectious bronchitis	—	+	+	+
Swine Influenza	—	+	+	+
Vesicular stomatitis	—	+	+	+
Newcastle	—	—	+	+
Feline pneumonitis	—	—	+	+
Mouse pneumonitis	—	—	+	+

*— Indicates no virus activity

§ + Indicates virus activity

In feuchtem Milieu waren alle 15 Viren inaktiviert.

In lyophylisiertem Zustand waren nur 6 Viren nach

16 Stunden inaktiviert. Unter den 9 nicht inaktivierten Viren befand sich das Encephalomyelitis- und das Influenzavirus.

III) Keimtötende Wirkung eines Gasgemisches von 90 % Kohlendioxyd und 10 % Äthylenoxyd bei einem Druck von 5 atü auf unterschiedliche Viren

a) Versuchsanordnung

1) Apparative Voraussetzungen

Wir prüften die keimtötende Wirkung des Äthylenoxyds in einer von uns entwickelten Apparatur wie folgt:

Ein Vulkanisierkessel aus der zahnärztlichen Praxis diente uns als Sterilisiererraum. Aus einer Flasche mit einem Gasgemisch von 90 % Kohlendioxyd und 10 % Äthylenoxyd wurde das Gasgemisch

über eine Kupferleitung in den Kessel eingelassen. Der genaue Druck im Versuchsraum konnte an einem Druckmesser, der an der Zuleitung vor dem Kessel angebracht war, abgelesen und reguliert werden. Das Abgas wurde über die Zuleitung, und über einen kurz vor der Gasflasche angebrachten Absorber ins Freie abgeführt. Die Temperatur erreichten wir dadurch, daß der Kessel in einem von zwei Tauchsiedern beheizten Wasserbad mit Umwälzung stand. Durch einen Kontaktthermometer, das über ein Relais vor die Tauchsieder geschaltet war, konnte die Temperatur konstant gehalten werden. Vorversuche hatten uns gezeigt, daß die Temperatur im Kessel um zwei Grad niedriger war als im Wasserbad. War also eine Temperatur von 45°C erwünscht, so mußten wir das Kontaktthermometer auf 47°C einstellen. Um sicher 45°C Wärme im Versuchsraum zu haben, heizten wir den Sterilisiererraum an (vergleiche KIMMICH (29), KAUFMANN (28)). Das Äthylenoxyd, der wichtigste Faktor bei unserer Sterilisationsmethode, ist bei gewöhnlicher Temperatur ein farbloses Gas, das bei $10,8^{\circ}\text{C}$ schnell flüssig wird und bei $111,3^{\circ}\text{C}$ gefriert. Sein spezifisches Gewicht ist 0,8838. Das Gas hat einen angenehmen ätherartigen Geruch. Die Folgen einer Vergiftung sind ungefähr einer Ammoniumvergiftung gleichzusetzen (BRODFORSS) (5). Die Formel $\text{CH}_2\text{---CH}_2$ lautet:

Es stellt also den ein- O

fachsten Äther der Ätherreihe oder ein Epoxyd dar. Die Verbindung wird wie Formaldehyd im großen gewonnen und zur Herstellung anderer organischer Chemikalien gebraucht. Es kommt in flüssigem Zustand, rein oder als Gasgemisch von 10 % Äthylenoxyd und 90 % Kohlendioxyd unter dem Namen "Carboxyd" in den Handel. Der Grund, daß reines Äthylenoxyd mit Kohlendioxyd gemischt wird, liegt darin, daß reines Äthylenoxyd leicht brennbar ist und nur 3 % (JONES und KENNEDY) (26) seiner Dämpfe genügen, um einen Bran hervorzurufen. Wird das Gas komprimiert, so entsteht eine starke Explosion. Um eine Sterilisation in der Praxis zu erreichen, müßte man eine Konzentration von 40 - 60 % Äthylenoxyd nehmen. Die Einwirkungszeit wäre 4 - 6 Stunden. Dieses Gas hätte aber den bedeutsamen Nachteil der Entflammbarkeit. Dieser Nachteil ist bei dem Hygienischen Institut in Mainz entwickelten Verfahren, das mit einem Äthylenoxyd - CO₂ - Gemisch im Verhältnis 1 : 10 und einem Überdruck von 5 Atm. arbeitet, nicht mehr vorhanden.

2) Vorbereitung der Testobjekte

Als Keimunterlagen für Viren dienten uns:

- a) Sterile Leinenlappchen
- b) Steriles Serum
- c) Sterile physiologische Kochsalzlösung

Die Leinenlappchen wurden in eine Aufschwemmung von Viren gelegt und so infiziert. Nach Entnahme aus der Infektionslösung wurden sie

der Einwirkung des Äthylenoxyds ausgesetzt. Die sterile physiologische Kochsalzlösung und das sterile Serum wurden durch Einpipettierung einer Virussuspension infiziert. Die Suspension des Theiler-Virus wurde aus infiziertem Mäusegehirn gewonnen. Und zwar wurde das Gehirn mit 2,7 ml Ringerlösung in Schüttelflaschen mit Glasperlen zerkleinert. Die Mischung von Gehirn und Ringerlösung wurde anschließend 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit abgeschüttet und mit physiologischer Kochsalzlösung weiter verdünnt. Wir stellten aus der Ausgangslösung eine Verdünnung 1 : 10 und 1 : 100 her. Bei der Behandlung des Serums mit Äthylenoxyd verwendeten wir eine Serumverdünnung der Ausgangslösung von 1 : 15 und 1 : 25.

3) Testkeime

Wie wir bereits an Hand von Literaturausgaben ausführlich erörtert haben, besitzen Viren Chemikalien gegenüber eine unterschiedliche Resistenz. Um also Aussagen darüber machen zu können, ob unser chemisches Sterilisationsverfahren Viren inaktiviert, mußten wir mit Testkeimen arbeiten, deren Resistenz chemischen Stoffen gegenüber unterschiedlich ist. Aus diesem Grunde wählten wir einerseits Viren, die auf Desinfektionsmittel gut ansprechen (Influenzaviren), andererseits solche, die die höchste Chemoresistenz aufweisen und zwar das Theiler-Virus (GÖNNERT und BOCK). Weiterhin arbeiteten wir mit den als chemoresistent geltenden Coli-T₃-Phagen.

4) Sterilisationsverfahren

Die mit den Viren infizierten Testobjekte wurden in den Druckkessel getan und der Wirkung des Äthylenoxyds ausgesetzt (vergl. KIMMICH (29)). Es wurde bei Einwirkungszeiten von 30 bis 250 Minuten, bei Temperaturen von 45° C und 55° C und einem Druck von 5 atü sterilisiert.

Nach KIMMICH (29) hatten wir es mit folgenden Konzentrationen von Äthylenoxyd zu tun:

bei 45° Celsius mit 885,6 mg/l und

bei 55° Celsius mit 842,4 mg/l.

Ein sehr wichtiger Faktor bei der Sterilisation mit Äthylenoxyd ist die Luftfeuchtigkeit. KLEWE und LAMMERS (30) fanden, daß Äthylenoxyd die stärkste keimtötende Wirkung bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 28 % entfaltet. LAMMERS und KIMMICH (29) errechneten eine relative Feuchtigkeit des Äthylenoxyd - CO₂ - Luftgemisches von 1,72 %, sodaß wir gezwungen waren, das Gasgemisch in unserem Kessel anzufeuchten.

5) Überprüfung des Sterilisationserfolges

Die Überprüfung der Inaktivierung der Viren führten wir wie folgt durch:

Die mit Phagen infizierten Leinenlappchen kneteten wir nach der Sterilisation in physiologischer Kochsalzlösung aus und tropften einen Tropfen dieser Flüssigkeit bzw. höherer Verdünnung auf eine mit dem zugehörigen Colistamm beimpfte Agarplatte.

Nach Bebrütung der Kulturen wurden die Phagenlöcher des Bakterienrasens ausgezählt. Außerdem gaben wir einen Tropfen der Spülflüssigkeit des Leinenlappchens in eine Bouillonkultur des zugehörigen Colistammes. Auf diese Weise konnten wir vereinzelte überlebende Phagen nachweisen. Die infizierte physiologische Kochsalzlösung und das infizierte Serum wurden flüssigen und festen Kulturen des zugehörigen Colistammes zugegeben.

Die Influenzaviren wurden durch Überimpfung auf bebrütete Hühnereier nachgewiesen. Wir gaben jeweils 0,3 ml Flüssigkeit in die Allantoishöhle des Hühnerembryos. Nach 9 Tagen Bebrütung überprüften wir das Wachstum der Influenzaviren in der Allantoishöhle mit dem Hühnerblut-Agglutinationstest. Das Theiler-Virus wiesen wir durch Überimpfung auf weiße Mäuse nach. Und zwar verimpften wir 0,3 ml intracerebral unter Äthernarkose. Das Überleben des Theiler-Virus ließ sich an typischen Lähmungserscheinungen und dem Tod der Tiere erkennen.

b) Versuchsergebnisse mit Phagen

Es wurden in den ersten Versuchsreihen Coli-T₃-Phagen in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, in sterilen Wassermannröhrchen mit Watteverschluß eingebracht und bei 45° C bzw. 55° C sterilisiert. Nach der Behandlung des Materials prüften wir die Keimzahl. Aus dem Vergleich der Keimzahl unbehandelter Kontrollen mit den so ermittelten Keimzahlen ergab sich die keimtötende Wirkung des Äthylendioxyds auf Phagen.

Tabelle 3

Wirkung des Äthylenoxyds auf suspendierte Coli-T₃-Phagen in physiologischer Kochsalzlösung:

Einwirkungstemperatur 45° C

Phagen-Keimzahl der Suspension/ml			
Vor der Sterilisation	10 ⁸ (+)	10 ⁶ (+)	10 ⁴ (+)
Nach 120 Min.	- (-)	- (-)	- (-)
Nach 100 Min.	- (-)	- (-)	- (-)
Nach 80 Min.	- (-)	- (-)	- (-)
Nach 70 Min.	- (-)	- (-)	- (-)
Nach 60 Min.	- (-)	- (-)	- (-)
Nach 50 Min.	- (-)	- (-)	- (-)
Nach 45 Min.	10 ⁴ (+)	10 ³ (+)	10 ² (+)

() = Werte der Anreicherung in Bouillon

Die längste Einwirkungszeit betrug 120 Minuten. Nach dieser Einwirkung des Gasgemisches auf die Phagen konnte keinerlei Wachstum festgestellt werden. Die Zeit wurde durchschnittlich um 20 Minuten innerhalb der Versuchsreihe vermindert. Es galt, den genauen Zeitpunkt zu ermitteln, an dem die Phagen gerade noch abgetötet waren. Für die Phagen in physiologischer Koch-

salzlösung suspendiert war der Zeitpunkt 50 Minuten, da sich die Phagen bei einer Einwirkungszeit von 45 Minuten in den Subkulturen noch vermehrten (vergl. Tabelle 3). In der zweiten Versuchsreihe wurden von uns Leinenläppchen mit Phagensuspension getränkt und ebenfalls in sterilen Wassermannröhrchen sterilisiert.

Tabelle 4

Wirkung von Äthylenoxyd auf mit Coli-T₃-Phagen infizierte Leinenläppchen:

Einwirkungstemperatur 45° C

Phagen-Keimzahl der Leinenläppchen				
Waschflüssigk. un- verd. 1,0 ml	verdünnt 1 : 10	verdünnt 1 : 100	verdünnt 1 : 1000	
Unbehandelt	Unzählb.	Unzählb.	Unzählb.	Unzählb.
Nach 120 Min.	-(+)	-(+)	-(+)	-(+)
Nach 100 Min.	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Nach 80 Min.	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Nach 60 Min.	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Nach 45 Min.	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Nach 40 Min.	unzb. (+)	2000(+)	300(+)	41(+)
Nach 30 Min.	" (+)	unzb. (+)	ca. 1000(+)	ca. 200(+)

() = Ergebnisse des Anreicherungsverfahrens
Auch hier konnte nach 120 Minuten Einwirkungs-

zeit des Gasgemisches auf die Phagen kein Wachstum festgestellt werden. Der Zeitpunkt, bei dem die Phagen gerade abgetötet waren, lag bei 45 Minuten. Nach 30 und 40 Minuten Einwirkungszeit wurden vermehrungsfähige Phagen nachgewiesen (vergl. Tabelle 4).

Die nächste Versuchsreihe wurde mit in Serum suspendierten Phagen durchgeführt, um zu erkennen, wie weit das Serum die keimtötende Wirkung des Äthylenoxyds reduziert.

Tabelle 5

Wirkung von Äthylenoxyd auf Coli-T₃-Phagen in Serum suspendiert:

Einwirkungstemperatur 45° C

	Phagen-Keimzahl der Suspension/ml		
Vor der Sterilisation	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴
Nach 120 Min.	-(-)	-(-)	-(-)
Nach 100 Min.	-(-)	-(-)	-(-)
Nach 80 Min.	-(-)	-(-)	-(-)
Nach 70 Min.	10 ³ (+)	10 ² (+)	11(+)

() = Werte der Aufweichung in Bouillon

Im Sterilen Serum suspendierten Phagen waren erst bei einer Einwirkungszeit von 80 Minuten inaktiv. Nach 70 Minuten langer Einwirkungszeit konnten noch vermehrungsfähige Phagen nachge-

wiesen werden (vergl. Tabelle 5).

Die folgenden Versuche wurden bei einer Einwirkungstemperatur von 55° durchgeführt.

Tabelle 6

Wirkung von Äthylenoxyd auf suspendierte Coli-T₃-Phagen in physiologischer Kochsalzlösung:
Einwirkungstemperatur 55° C

Phagen-Keimzahl der Suspension/ml	
Vor der Sterilisation	10 ⁸ (+)
Nach 90 Min.	-(-)
Nach 60 Min.	-(-)
Nach 40 Min.	-(-)
Nach 30 Min.	10 ² (+)
Nach 20 Min.	10 ³ (+)

() = Werte der Aufweichung in Bouillon

Durch Äthylenoxyd wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendierte Phagen bei einer Einwirkungstemperatur von 55° C bereits innerhalb von 40 Minuten vollständig inaktiviert. Es tauchte nun die Frage auf, ob diese rasche Inaktivierung von Phagen in physiologischer Kochsalzlösung, die in gestopften Wassermannröhrchen in den Drucktopf kamen, auch dann erfolgt, wenn die Phagen auf Leinenläppchen aufgebracht wurden. Wie die folgenden Ergebnisse

der Tabelle 7 zeigen, wirkt Äthylenoxyd bei 55° C auch auf mit Phagen infizierte Leinenläppchen stärker desinfizierend als bei 45° C (vergl. Tabelle 4 mit Tabelle 7).

Tabelle 7.

Wirkung von Äthylenoxyd auf mit Coli-T₃-Phagen infizierte Leinenläppchen bei 55° C

Phagen-Keimzahl der Leinenläppchen			
	Waschflüssigkeit unverdünnt 1,0 ml	verdünnt 1 : 10	
Unbehandelt	unzählbar (+)	unzählbar (+)	
Nach 90 Minuten	- (-)	- (-)	
Nach 60 Minuten	- (-)	- (-)	
Nach 40 Minuten	- (-)	- (-)	
Nach 30 Minuten	- (-)	- (-)	
Nach 20 Minuten	- (-)	- (-)	

() = Werte der Aufweichung in Bouillon

Wirkung von Äthylenoxyd auf Influenzaviren

Die Influenzaviren wurden durch Züchtung im Hühnerei nachgewiesen. Ihre Vermehrung im Hühnerei objektivierte wir mit Hilfe der Hühnerblut-Agglutination. Je höher die Allantoisflüssigkeit eines infizierten und bebrüteten Hühnereis in der Verdünnungsreihe Hühnerblutkörperchen agglutiniert, desto mehr Viren sind in der Flüssigkeit enthalten. Um Aufschluß über die Inaktivierung mit

von Influenzaviren mit Äthylenoxyd zu erhalten, untersuchten wir zunächst, ob sich die Fähigkeit der Grippeviren, Hühnerblutkörperchen zu agglutinieren, durch die Behandlung mit Äthylenoxyd verändert. Um diese Frage beantworten zu können, prüften wir zunächst den Keimgehalt der Allantoisflüssigkeit infizierter, bebrüteter Hühnereier mit der Haemagglutination. Wir verwendeten für unsere Versuche Allantoisflüssigkeit mit einem Titer von 1 : 2560, das heißt, die Allantoisflüssigkeit agglutinierte Hühnerblutkörperchen bis zu einer Verdünnung von 1 : 2560. Diese Allantoisflüssigkeit haben wir im Verhältnis 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung und im Verhältnis 1 : 15 mit sterilem Serum weiterverdünnt. ~~Diesen~~ Verdünnungen wurden der Wirkung des Äthylenoxyds ausgesetzt, und zwar beschickten wir unseren Druckkessel mit gestopften Wassermannröhrchen, die 0,5 ccm der Verdünnung enthielten. Nach der Äthylenoxydeinwirkung überprüften wir das Hamemagglutinationsvermögen der Verdünnung mit folgenden Ergebnissen:

Tabelle 8

Haemagglutinationsvermögen mit Äthylenoxyd behandelter Aufschwemmung von Influenzaviren in physiologischer Kochsalzlösung und in sterilem Serum:

Haemagglutinationstiter

	physiolog.Kochsalzlös.	Serum
Vor der Steri-		
lisation	1 : 1090	1 : 1090
Nach 250 Min.	-	-
Nach 200 Min.	-	1 : 730
Nach 150 Min.	-	1 : 1011
Nach 100 Min.	-	1 : 1057
Nach 80 Min.	-	1 : 1090
Nach 60 Min.	1 : 740	1 : 1090

- = Verlust der Haemagglutinationsfähigkeit

Aus den Ergebnissen der Tabelle geht hervor, daß die Influenzaviren in physiologischer Kochsalzlösung bei einer Einwirkungszeit von 80 Minuten ihre Haemagglutinationsfähigkeit verloren haben, während sie bei einer Einwirkungszeit von 60 Minuten noch agglutinieren. Die Influenzaviren in Serum suspendiert verloren ihre Agglutinationsfähigkeit erst bei einer Einwirkungszeit von 250 Minuten. Dies ist ein Beweis dafür, daß Äthylenoxyd durch Serum einen Wirkungsverlust erleidet. Nun ist der Verlust der Haemagglutinationsfähigkeit von Grippeviren kein sicherer Beweis dafür, daß die Viren auch ihre Vermehrungstüchtigkeit eingebüßt haben, andererseits ist es möglich, daß die Viren rascher inaktiviert werden als ihre Fähigkeit zur Hühnerblutagglutination verloren geht, das heißt, Viren können sogar dann vermehrungsfähig sein, wenn

sie noch stark agglutinieren. Den Nachweis der Vermehrungstüchtigkeit der Grippeviren bei noch vorhandener Agglutinationsfähigkeit objektivierten wir durch Beimpfung von Hühnereiern mit der behandelten Virusaufschwemmung. Die Vermehrung im Hühnerei wurde mit Hilfe der Hühnerblutagglutination festgestellt. Die erzielten Ergebnisse gibt die Tabelle 9 wieder.

Tabelle 9

Inaktivierung von Grippeviren durch Äthylenoxyd
(Agglutinationsfähigkeit der Allantoisflüssigkeit infizierter Hühnereier)

Agglutinationstiter	
Vor der Sterilisation	1 : 1060
Nach 250 Min.	-
Nach 200 Min.	-
Nach 150 Min.	-
Nach 100 Min.	-
Nach 80 Min.	-
Nach 60 Min.	-
Nach 40 Min.	-
Nach 20 Min.	1 : 640

Die Tabelle zeigt deutlich, daß die Viren nach einer Sterilisationszeit von 40 Minuten nicht mehr vermehrungsfähig sind, obwohl sie laut Tabelle 8 ihre Agglutinationsfähigkeit besaßen. Eine Einwirkungszeit von 20 Minuten genügt nicht, um die Grippeviren, in physiologischer Koch-

salzlösung suspendiert, zu inaktivieren.

Wirkung von Äthylenoxyd auf Theiler-Viren

Wir gingen von infiziertem Mäusegehirn als Infektionslösung aus. Hierzu verdünnten wir das durch sterilen Sand verriebene Mäusegehirn im Verhältnis 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung. Mit Serum wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1 : 15 hergestellt. Die Suspension des infizierten Mäusegehirns in physiologischer Kochsalzlösung bzw. in Serum pipettierten wir in sterile Wassermannröhrchen ein und zwar in einer Menge von 0,5 ccm und setzten sie der Einwirkung des Äthylenoxyds aus. Die Überprüfung des Sterilisationserfolges geschah durch Verimpfung von 0,2 ccm des unter verschiedenen Bedingungen behandelten Materials intracerebral auf weiße Mäuse. Wir erhielten folgende Ergebnisse:

Tabelle 10

Inaktivierende Wirkung des Äthylenoxyds auf Theiler-Viren

Temperatur 45° C; Material: Infiziertes Mäusegehirn

Material in physiologischer Kochsalzl.			
	konzentriert	weiterverd.	
		1:10	1:100
Vor der Steri-	++	++	++
lisation			
Nach 120 Min.	-	-	-
Nach 100 Min.	-	-	-
Nach 80 Min.	-	-	-
Nach 60 Min.	-	-	-
Nach 50 Min.	+ / o	-	-
Nach 48 Min.	++	+ / o	-
Nach 46 Min.	++	++	+ / o
Nach 45 Min.	++	++	++

++ = Tier starb an der Infektion

- = Tier blieb gesund

+ / o = Tier erkrankte und überlebte

Die Ergebnisse der Tabelle 10 besagen, daß durch Äthylenoxyd Theiler-Viren in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, nach einer Einwirkungszeit von 60 Minuten inaktiviert waren. Nach einer Einwirkungszeit von 50 Minuten waren die Viren nicht vollkommen inaktiviert. Die mit dieser Virussuspension beimpften Mäuse erkrankten, starben jedoch nicht. Die weiterverdünnte Suspension im Verhältnis 1 : 10 des infizierten Mäusegehirns enthielt nach 50 Minuten Sterilisation keine aktiven Theiler-Viren mehr, die Verdünnung 1 : 100 nach 48 Minuten kein aktives Theiler-Virus mehr.

Tabelle 11

Inaktivierung von Theiler-Viren, die in Serum suspendiert wurden

Einwirkungstemperatur 45° C; Material: Infiziertes Mäusegehirn

Material in Serum suspendiert			
	konzentriert	weiterverdünnt	
		1:15	1:25
Vor der Sterilisation	++	++	++
Nach 220 Min.	-	-	-
Nach 200 Min.	-	-	-
Nach 190 Min.	++	++	++
Nach 180 Min.	++	++	++

++ = Tier starb an der Infektion

- = Tier blieb gesund

Äthylenoxyd tötet Theiler-Viren in Serum suspendiert erst bei einer Einwirkungszeit von 200 Minuten ab.

IV) Diskussion

Wir fanden, daß die Inaktivierung von Viren mit Äthylenoxyd ebenso wie die Abtötung von Bakterien von der Konzentration des Gases, der Einwirkungstemperatur und von der Art des zu sterilisierenden Materials abhängig ist (vergl. KIMMICH und KAUFMANN).

Phagen

an Leinenlappchen haftend wurden wie folgt inaktiviert: Bei 45° C Einwirkungstemperatur und einem Druck von 5 atü waren die Phagen bei einer Einwirkungszeit von 40 Minuten abgetötet. Bei 55° C Einwirkungstemperatur und demselben Druck waren die Phagen schon nach 30 Minuten nicht mehr vermehrungsfähig.

In physiologischer Kochsalzlösung suspendierte Phagen waren bei 45° C Einwirkungstemperatur und einem Druck von 5 atü nach 45 Minuten abgetötet. Nach einer Einwirkungstemperatur von 55° C waren sie schon nach 40 Minuten tot. Phagen in sterilem Serum suspendiert waren bei 45° C und 5 atü Druck erst nach 80 Minuten abgetötet.

Influenzaviren

in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert wurden wie folgt inaktiviert:

Bei einer Einwirkungstemperatur von 45° C und einem Druck von 5 atü waren die Influenzaviren nach 40 Minuten Einwirkungszeit inaktiviert. Influenzaviren in Serum suspendiert waren bei 45° C und einem Druck von 5 atü erst nach 100 Minuten nicht mehr vermehrungsfähig.

Die Grippeviren verlieren ihre Agglutinationsfähigkeit für Hühnerblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert bei 80 Minuten Einwirkungszeit, sind jedoch bei 40 Minuten nicht mehr vermehrungsfähig. Sie waren also weit eher inaktiviert als ein Verlust ihrer Agglutinationsfähigkeit zu beobachten war.

Theiler-Viren

in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert wurden wie folgt inaktiviert:

Theiler-Viren waren bei einer Einwirkungstemperatur von 45°C und einem Druck von 5 atü nach 60 Minuten inaktiviert. In den Verdünnungen der konzentrierten Lösung im Verhältnis 1 : 10 waren die Viren nach 50 Minuten und im Verhältnis 1 : 100 nach 48 Minuten Einwirkungszeit inaktiviert. Theiler-Viren in sterilem Serum suspendiert waren bei einer Einwirkungstemperatur von 45°C und einem Druck von 5 atü in einer Einwirkungszeit von 200 Minuten inaktiv. Äthylenoxyd in einer Konzentration von 40 - 60 % bei normalem Druck inaktiviert Viren (Mäuseencephalomyelitivirus, Schweineinfluenzavirus, Kuhpockenvirus, Tollwutvirus u.a.) erst bei einer Einwirkungszeit von ca. 15 Stunden. Die etwa gleiche Äthylenkonzentration (885,6 mg/l inaktiviert Viren im Druckverfahren (5 atü) bereits innerhalb von 40 - 120 Minuten, wobei allerdings sehr lange Einwirkungszeiten benötigt werden, wenn die Viren in Serum suspendiert sind (Tabellen 5, 8 und 11).

V) ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde untersucht, inwieweit es möglich ist, mit einem Gasgemisch von 10 % Äthylenoxyd und 90 % Kohlendioxyd bei einem Druck von 5 atü Viren zu inaktivieren. Da Viren Chemikalien gegenüber eine unterschiedliche Resistenz aufweisen, wählten wir einerseits Viren, die auf Desinfektionsmittel gut ansprechen (Influenza-Viren), andererseits solche, die die höchste Chemoresistenz aufweisen und zwar das Theiler-Virus. Weiterhin arbeiteten wir mit dem als chemoresistent geltenden Coli-T₃-Phagen. Unsere Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, die verschiedenen Viren in unterschiedlichem Milieu bei einem Druck von 5 atü und einer Einwirkungstemperatur von 45° C und 55° C zu inaktivieren. Die Länge der Einwirkungszeit ist abhängig von der Art des Virus und von der Art des zu sterilisierenden Materials. Phagen an Leinenlappchen haftend waren bei 45° C und 5 atü Druck in 40 Minuten, in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert in 45 Minuten und in Serum suspendiert in 80 Minuten abgetötet. Wurde die Temperatur auf 55° C erhöht, so waren die Phagen an Leinenlappchen haftend schon nach 30 Minuten und in physiologischer Kochsalzlösung schon nach 40 Minuten abgetötet. Die Influenzaviren waren bei 45° C und 5 atü Druck in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert in 40 Minuten und in Serum suspendiert erst nach 100 Minuten inaktiviert. Theiler-Viren in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und bei 45° C und einem Druck von 5 atü sterilisiert, waren in 60 Minuten inaktiviert. Die in Serum suspendierten und unter den gleichen Bedingungen sterilisierten Theiler-Viren waren erst nach 200 Minuten inaktiviert.

Literaturverzeichnis

- 1) AMOS H.J. Exp.Med. 98, 365 (1953)
- 2) ANDREWS C.H. und J.gen.Microbiologie 3, 290
HORSTMANN D.C. (1949)
- 3) BERGEY D.H. (ED.) Manual of Determinative
Bacteriology 6 ed. Suppl.
No. 2. Baltimore 1948
- 4) BOCK M. Arzneimittelforschung
 6, 527-531 (1956)
- 5) BODFORSS S. Die Äthylenoxyde.
 Stuttgart 1920
 pp. 202
- 6) BROWN A. I. Infections Disease
ITATTANI M.K. und 91, 184-190 (1952)
MOULDER J.W.
- 7) BURNET F.M. und Australien, J. Exptl. Biol.
LUSH D. Med. Sci.
 18, 141-150 (1940)
- 8) COTTON R.T. und Indust. Eng. Chem.
ROARK R.C. 20, 805 (1928)
- 9) CUNNINGHAM C.H. Am. J. Vet. Research
 9, 195-197 (1948)
- 10) DEUTSCH M. und Archiv für Hygiene und
ROHR E. Bakteriolog.
 Band 139, Heft 8
- 11) DOERR, R. und (ED.) Handbuch der Virus-
HALLAUER C. forschung, J.Springer Wien
 1938 - 39
- 12) DUNHAM W.B. and J. Lab. & Clin. Med.
MAC NEAL W.J. 28, 947-953 (1943)

- 13) ENDERS J.F. in
RIVERS T.M. (ED.) Viral and Rickettsial
infect. of Man. Lippincott
Co., Philadelphia (1952)
- 14) FLEXNER S. and
LEWIS A.P. J. Am. Med. Assoc.
53, (1913)
- 15) GELLIS S.S. und
Mitarbeiter J. Clin. Invest.
27, 239 (1948)
- 16) GEHWALT Med. Diss. Mainz (1956)
- 17) GINSBERG H.S. and
WILSON A.T. Proc. Soc. Expt. Biol. and
Med. 73, 614 (1950)
- 18) GÖNNERT R. und
BOCK M. Arzneimittelforschung
6, 522-527 (1956)
- 19) GORDON M.H. Privy Council, Medical
Research Council, Special
Series
No. 98, London (1925)
- 20) HAAS R., KELLER W.
und KIKUTH W. Dtsch. Med. Wschr.
273, (1955)
- 21) HAAS R. und
Mitarbeiter Zeitschr. f. Hygiene
143, 490-512 (1957)
- 22) HABEL K. Publ. Health. Rep. Wash.
D.C., 60, 201 (1945)
- 23) HECKE F. Zbl. Bakt. I. Orig.
228, 336 (1933)
- 24) HERSHEY A.D. und
Mitarbeiter J. gen. Physiol.
34, 305 (1952)
- 25) JONES M. Proc. Soc. Exper. Med.
58, 315 (1945)
- 26) JONES G.W. and
KENNEDY R.E. Ind. Eng. Chem.
22, 146-158 (1930)
- 27) KAY S., IRMINGER H.F./J. Lab. Clin. Med
and PHILIPS C.R. 40, 67-72 (1952)

- 28) KAUFMANN N. Med. Diss. Mainz (1957)
- 29) KIMMICH J. Med. Diss. Mainz (1957)
- 30) KLIEWE H. und
LAMMERS TH. Der praktische Schädlings-
bekämpfer
5, 51-52 (1956)
- 31) LEPIN P. und
LEVADITI C. (ED.) Les ultravirus des
maladies humaines Maloine
Paris (1948)
- 32) LIGHT J.S. and
HODES F.L. Am. Jour. Public Health
33, 1451-1454 (1943)
- 33) LORING H.L. J. gen. Physiol.
25, 497, (1941)
- 34) LÖWENSTEIN A. Klin. Mbl. Augenheilk.
64, 15 (1920)
- 35) LOJKIN M. und
VINSON C.G. Zit. von Sinkowics "Die
Grundlagen der Virusforsch."
S. 51 (1956)
- 36) LOJKIN M. Contr. Boyce Thomp. Inst.
8, 335-445 (1937)
- 37) MATHEWS J. and
HOFSTADT M.S. Cornell Veterinarian
43, 452-461 (1953)
- 38) Mc CULLOCH Desinfektion und Sterili-
sation 2nd ed., Philadelphia
Lea & Febinger
- 39) MEYER K.F. in
RIVERS T.M. (ED.) Viral and Rickettsial
infections of Man. Lippin-
cott Co. Philadelphia
(1952)
- 40) MOCSY J. Dtsch. tierärztl. Wschr.
43, 211 (1935)
- 41) MURRAY R. and
DIEFFENBACH W.C.L. Proc. Soc. exper. Biol.
and Med.
84, 230-231 (1953)

- 42) NEEFE J.R. Med. Clin. N. Amer
30, 1407-1443 (1946)
- 43) RANSON S.E. und Am. J. Hyg.
HUEBNER R.J. 53, 110-119 (1951)
- 44) REMLINGER P. Acad. Sci.
166, 750 (1919)
- 45) RÖMER G.B. Dtsch. Med. Wschr.
719-723 (1954)
- 46) ROOYEN van. C.E. Virus Disease of Man. Th.
und RHODES A.J. Nelson New York (1948)
- 47) SALK J.E. J. Am. Med. Assoc.
151, 1081-1098 (1953)
- 48) SALCHOW A. Dtsch. Med. Wschr.
1200-1201 (1952)
- 49) SCHWERDT C.E. und Am. J. Hyg.
Mitarbeiter 53, 121-130 (1951)
- 50) SINKOWICS A. Grundlagen der Virusforschg.
51-63 (1955)
- 51) SMITHBURN K.C. J. Immunol.
25, 43 (1942)
- 52) SMORODINTSEW A. EN 61 (1941)
und Mitarbeiter
- 53) SMORODINZEWA O.A. AHM CCCP
28, 49 (1935)
- 54) STANLEY W.M. Phytopath.
24, 1055, 1269 (1934)
- 55) STOCK C.C. und J. Exp. Med.
FRANCIS T.J.R. 71, 661-681 (1940)
- 56) SCHUBLADSE A.K. Kurzer Lehrgang für Virus-
und GAIDAMOWITSCH forschung (1948)

- | | | |
|----------------------------|-----------------------------------|--------|
| 57) THEILER A. | Sci. Bull 1911 | (1921) |
| 58) TOWARNISKI W. | J. 22 | (1947) |
| 59) YAOI H. und
KASAI H | J. Exp. Med
<u>2</u> , 619-635 | (1931) |

Zum Schluß erlaube ich mir, den Herren
Prof. Dr. H. Kliewe
Direktor des Hygienischen Instituts der
Universität Mainz
und

Privatdozent Dr. Theo Lammers
für die Überlassung des Themas, die Durch-
sicht und Förderung der Arbeit meinen er-
gebensten Dank auszusprechen.

L e b e n s l a u f

Ich wurde als Sohn des Oberstudienrates Karl Heider und seiner Ehefrau Frida, geborene Forschner, als zweites Kind am 14. September 1930 in Isny im Allgäu geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und anschließend die Oberschule bis zur mittleren Reife. In der Oberschule Wilhelmsdorf durchlief ich die Oberstufe und legte dort die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1953 begann ich das zahnmedizinische Studium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Am 22. November 1954 legte ich die zahnärztliche Vorprüfung und am 21. Dezember 1956 das zahnärztliche Staatsexamen vor dem Prüfungsausschuß in Mainz ab.

